

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

特許第3052150号

(P 3 0 5 2 1 5 0)

(45) 発行日 平成12年 6 月12日 (2000. 6. 12)

(24) 登録日 平成12年 4 月 7 日 (2000. 4. 7)

(51) Int. Cl. 7

識別記号

F I

G02B 21/00

G02B 21/00

請求項の数15 (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平3-506697

(86) (22) 出願日 平成 3 年 4 月 5 日 (1991. 4. 5)

(65) 公表番号 特表平5-506318

(43) 公表日 平成 5 年 9 月16日 (1993. 9. 16)

(86) 国際出願番号 P C T / A U 9 1 / 0 0 1 2 9

(87) 国際公開番号 W O 9 1 / 1 5 7 9 2

(87) 国際公開日 平成 3 年10月17日 (1991. 10. 17)

審査請求日 平成10年 4 月 2 日 (1998. 4. 2)

(31) 優先権主張番号 P J 9 5 3 8

(32) 優先日 平成 2 年 4 月 6 日 (1990. 4. 6)

(33) 優先権主張国 オーストラリア (A U)

(31) 優先権主張番号 P K 1 5 7 1

(32) 優先日 平成 2 年 8 月 3 日 (1990. 8. 3)

(33) 優先権主張国 オーストラリア (A U)

(73) 特許権者 999999999

オブティスキャン・ピーティワイ・リミ
テッド

オーストラリア国 ヴィクトリア 3168
ノッティング・ヒル ノーマンビー・
ロード 27

(72) 発明者 ハリス, マーティン, ラッセル

オーストラリア国 ヴィクトリア 3175
ダンデノン スタッド・ロード 9

(74) 代理人 999999999

弁理士 北村 修一郎

審査官 笹野 秀生

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 共焦点顕微鏡

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の構成を備えた走査型共焦点エビ照明
顕微鏡

光源

光源から照明光を受けて伝搬する光ファイバ手段、

光ファイバ手段を介して伝搬される照明光を受け、照明
光を対象物に集光して、対象物上またはその内部の観察
場を照明し、そして観察場から発する光を受け、発した
光を照明光と逆の方向に戻る光として光ファイバ手段に
沿って戻すための集光手段、

戻り光を照明光から分離するための光分離手段、

光分離手段から戻る光を受け、感光手段を戻り光に露光
するための戻り光受け手段、そして

走査路において前記対象物に対して照明光を移動させる
と同時に、対応する走査路において感光手段に対して戻

2

り光を移動させることによって、感光手段に戻り光から
走査対象物の像を生成させる走査手段。

【請求項 2】 走査手段が、光ファイバ手段から伝送され
た照明光を対象物へ移動させる第 1 スキャナと、光分離
手段から伝送された戻り光を光受け手段へ移動させる第
2 スキャナと、第 1 および第 2 スキャナの走査動きを調
整するスキャナ制御手段とからなる請求項 1 に記載の顕
微鏡。

【請求項 3】 光ファイバ手段が、照明光を光源から光分
離手段へ伝搬する第 1 光ファイバと、戻り光を光分離手
段から戻り光受け手段へ伝搬する第 2 光ファイバとから
なる、請求項 2 に記載の顕微鏡。

【請求項 4】 光分離手段が、光源から集光手段への照明
光の伝搬と集光手段からカプラーへの戻り光の伝搬ため
の光路を形成する第 3 光ファイバに前記第 1 および第 2

ファイバを結合させる光ファイバカプラーからなる、請求項3に記載の顕微鏡。

【請求項5】第1走査手段が第3光ファイバから集光器へ伝搬される照明光を移動させ、第2走査手段が第3光ファイバから光受け手段へ伝搬される戻り光を移動させる請求項4に記載の顕微鏡。

【請求項6】第1および第2走査手段が可動光反射器からなる請求項5に記載の顕微鏡。

【請求項7】光分離手段が、光源と光ファイバ手段の間に設けられたビームスプリッタからなる請求項1または請求項2に記載の顕微鏡。

【請求項8】光ファイバ手段が、光源から照明光を受ける第1束端から、照明光が集光器へ伝搬され、かつ対象物から発する光が集光器によって集光される第2ファイバ束端へ、並んで長さ方向に延びた光ファイバの束からなる請求項7に記載の顕微鏡。

【請求項9】光ファイバが単一モードファイバである請求項8に記載の顕微鏡。

【請求項10】光分離手段が、光源と光ファイバ手段の間に設けられたビームスプリッタからなり、光ファイバ手段が、光源から照明光を受ける第1束端から、照明光が集光器へ伝搬され、かつ対象物から発する光が集光器によって集光される第2ファイバ束端へ、並んで長さ方向に延びた光ファイバの束の間、中間像焦点面に位置するアパーチャ手段を備えた光スクリーンからなり、照明光と戻り光の両方がアパーチャ手段とスキャン発生器を通して走査動をアパーチャ手段を含むスクリーンへ与える請求項1に記載の顕微鏡。

【請求項11】前記走査動が照明および戻り光を横切る請求項10に記載の顕微鏡。

【請求項12】アパーチャ手段が、照明光と反射光の両方が集束される中間焦点面に位置する、請求項10または11に記載の顕微鏡。

【請求項13】アパーチャ手段が、ファイバ束を横切る方向に間隔をあけた複数の照明光ビームと、対象物から発する補完的複数の戻り光を生成する複数の個々のアパーチャからなり、スキャン発生器がスクリーンを往復動させる、請求項10~12のいずれかに記載の顕微鏡。

【請求項14】集光器が、光ファイバ手段の第2ファイバ束端に取り付けられた内視鏡ヘッド内に設けられたレンズ手段からなる請求項10~13のいずれかに記載の顕微鏡。

【請求項15】戻り光受け手段が、前記像を写真像として生成する感光手段としての写真フィルムを保持する構成のカメラレシーバからなる、請求項1~14のいずれかに記載の顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

技術分野

この発明は、顕微鏡法、特に走査型共焦点顕微鏡に関

する。

走査型共焦点顕微鏡の原理はマービン・ミンスキー (Marvin Minsky) のアメリカ特許3,013,467号に開示されている。その基本原理は、観察される標本または対象物が限定領域に限られ、観察または検出がその照明域に限られる、というものである。顕微鏡の視野全体を通して、観察される標本または対象物を領域ごとに走査することによって、全体像が得られる。

共焦点顕微鏡は、焦点はずれ信号と干渉が大幅に減少されるので、普通の顕微鏡より解像度がよく、精細度がより鮮鋭である。それらは、焦点はずれ干渉の減少が大きな利点となる、エビ蛍光による生物標本の検査に特に利用されている。

国際特許出願第PCT/AU89/00298号は、種々の形状の共焦点顕微鏡でのファイバーオプティクスの使用を開示している。本発明はファイバーオプティクスをタンデム走査型顕微鏡に適用し、そこでは、リアルタイム像を生成するために、標本に対する照明光の走査とタンデムで、戻り共焦点光が写真フィルム、二次元CCDチップまたは他の感光手段に対して走査される。この種の顕微鏡は公知で、顕微鏡システムの中間焦点面と面が一致する不透明材の非常に薄いシートの一連のピンホールまたは1つ以上のスリットの動きによって、観察される標本の焦点面の分離が従来のレンズ系で達成される。このようなシステムは、例えば、ザ・ハンドブック・オブ・バイオロジカル・コンフォーカル・マイクロスコピー、ジェームズ・ポーリー編集者、アイエムアール・プレス、1989 (The Handbook of Biological Confocal Microscopy, James Pawley editor, IMR Press, 1989) に記載されているように、ペトラン、キノ他 (Petran, Kino and others) によって記載されている。

本発明によれば、照明光および戻り共焦点光の伝達体として働く1本以上の光ファイバを介して、被検査物への、およびそれから光が伝搬される。発明によるいくつかの構成では、光ファイバが、観察される標本の焦点面の分離を可能にする効果的なピンホールを形成する。発明の他の実施例では、焦点面の分離を生成する空間フィルタが、ファイバのコア自体ではなく、別のレンズによって生成される中間焦点面に設けられる。この場合、空間フィルタは、中間焦点面に一致する不透明材の薄いシートからなり得る。

発明の開示

発明によれば、以下の構成を備えた走査型共焦点エビ照明顕微鏡が提供される、

光源、

光源から照明光を受けて伝搬する光ファイバ手段、

光ファイバ手段を介して伝搬される照明光を受け、照明光を対象物に集光して、対象物上またはその内部の観察場を照明し、そして観察場から発する光を受け、発した光を照明光と逆の方向に戻る光として光ファイバ手段

に沿って戻すための集光手段、

戻り光を照明光から分離するための光分離手段、

光分離手段から戻る光を受け、感光手段を戻り光に露光するための戻り光受け手段、そして

走査路において前記対象物に対して照明光を移動させると同時に、対応する走査路において感光手段に対して戻り光を移動させることによって、感光手段に戻り光から走査対象物の像を生成させる走査手段。

走査手段は、光ファイバ手段から伝送された照明光を対象物へ移動させる第1スキャナと、光分離手段から伝送された戻り光を光受け手段へ移動させる第2スキャナと、第1および第2スキャナの走査動きを調整するスキャナ制御手段とからなるものでもよい。

別構成では、光分離手段が、光源と光ファイバ手段の間に設けられたビームスプリッタからなり、光ファイバ手段が、光源から照明光を受ける第1束端から、照明光が集光器へ伝搬され、かつ対象物から発する光が集光器によって集光される第2ファイバ束端へ、並んで長さ方向に延びた光ファイバの束からなり、走査手段が、ビームスプリッタと光ファイバの束の間の中間像焦点面に位置するアパーチャ手段を備えた光スクリーンからなり、照明光と戻り光の両方がアパーチャ手段とスキャン発生器を通してスクリーンとアパーチャ手段を照明および戻り光を横切って移動させる。

発明をより完全に説明するために、いくつかの具体的実施例を添付図を参照しながら詳細に説明する。

図面の簡単な説明

図1は、発明に従って構成されたタンデム走査型共焦点顕微鏡を示し、

図2は、比較的安価な非干渉性光源の使用を可能にする、発明に従って構成された走査型共焦点顕微鏡の別形態を示し、

図3は、スリットまたは一連のピンホールを備えた単一の光スクリーンの動きによって走査が行われる、発明に従って構成された顕微鏡の更に別の形態を示し、そして

図4は、図3に示されたものと同様だが、特に内視鏡として作用するよう設計された顕微鏡を示す。

図1は、発明に従って構成された走査型共焦点顕微鏡システムを示す。この顕微鏡は、光ビーム2を供給するレーザ発生器1の形の高強度光源を備え、光ビームはレンズ3によってフレキシブルな光ファイバ4の一端内へ集束される。光ファイバ4の他端は方向性カプラー5の一侧内に延びているが、これは反対方向に進む光線を分離する接合双円錐テーパーカプラーまたは他の接合器でもよい。カプラーの他側の一方の出力肢6に入る光は、屈折率整合媒体7によって最少限のフレネル反射で吸収され、カプラーの同じ側の他の脚に入る光は、フレキシブルな光ファイバ8によってファイバ端9へ伝えられ、そこから10として概略が示された光学顕微鏡の光学系へと

伝えられる。

光学顕微鏡10は脚11を備え、その上に、機械的に調節可能な標本支持ステージ12と、顕微鏡の光学系を構成する部品を収容した顕微鏡本体13が取り付けられている。これら光学部品はファイバ8の端部9から広がる光15を受けるレンズ14と、レンズ14を透過した光を順次反射する一対のミラー16、17を含み、光はビーム集束レンズ19を通してレンズ18の形の集光器に達し、これが、ステージ12に支持された標本20内のスポットないしポイント観察場へ光を集光ないし集束する。

ミラー16、17は、反射光ビームのXおよびY方向の移動によって照明スポットが走査パターンで標本を横切るように、電気接続23、24を介して電子走査信号発生器25から供給される信号にตอบสนองして、トランスジューサ21、22によって動かすことができる。この種の走査手段は従来の走査型共焦点顕微鏡で使用されている。

高強度光を標本へ集束して照明スポットを生成することに加えて、集光レンズ18は標本から発する光をも受けとり、これは顕微鏡10の光学系を逆方向に透過して光ファイバ8へ到達する。標本の性質次第で、標本から発するこの光は、反射光、ラマン散乱光、または蛍光光であり得る。本明細書で使用する「発する」という言葉は、対象物から集光器を通して逆方向に伝えられるいかなる光をも含む、広い意味を持つものと理解されたい。

戻り光は光ファイバ8の端部9で再集束し、そのファイバを逆方向にカプラー5へ進み、この光の一部がカプラーの第4の脚と更に別の光ファイバ31を通してファイバ端32へ伝えられる。

分離された戻り光は、レンズ33によって端部32から集められ、一対の走査ミラー34、35によって、写真フィルム38を保持する公知手段が備えられたカメラ本体37からなるカメラの形の戻り光受け手段36へ偏向される。

走査ミラー34、35は、ミラー34、35がミラー16、17と正確に同期して動くように、電気接続43、44を介して電子走査信号発生器25から供給される信号にตอบสนองして、トランスジューサ41、42によって動かされる。従って、分離された戻り光はフィルム38上のスポットとして集束され、これは、写真フィルム上に像を生成するために、標本上の照明光の走査パターンに対して調整された走査パターンで移動される。フィルム上の投影スポットが顕微鏡ステージとまったく同じシーケンスでラスタースるように、2組の走査ミラーができるだけ正確に同期される。フライバック光と、2組のミラー16、17および34、35の速い走査動のわずかな位相差によって生じる二重イメージの可能性とを排除するために、走査ミラーと同期するが約90°位相をずらせてレーザービーム2を間欠的に遮断するビームチョッパ45を設けることができる。

図2は、水銀球等の比較的安価な非干渉光源を採用することのできる、別の顕微鏡システムを示す。照明源51からの光はレンズ52、53によって集光され、ビームスプ

リット立方体54によって光ファイバ束55の端部へ反射される。束55は、束端55から、反射防止ガラスシート58が取り付けられた遠隔束端57へ、互いに並んで長さ方向に延びた多数の単一モードファイバ56からなる。

ファイバ56のコアは照明光を干渉状態で伝搬し、照明光は反射防止ガラスシート58を通して、各ファイバコアごとに1本ずつの錘体光として出てくる。これらの錘体光はレンズ61、62、63によって、顕微鏡ステージ66上の標本65内の回折制限スポット64（より正確にはガウシアンウエスト）に集束される。レンズ61および62の間で、照明光は、照明スポット64をラスタパターンで走査させるスキャナ67を通過する。スキャナ67は、図1に示された顕微鏡の走査ミラーおよびトランスジューサと同様に配置された1対の反射ミラーおよびトランスジューサで構成することができ、走査信号発生器68から電気接続69、70を介して走査制御信号を受ける。

各照明スポットないしガウシアンウエストエリア64内から発生した蛍光は、レンズ63、62、61を通過して共焦点状に逆行し、照明光が当初に出てきたのと同じファイバ束のコアへ進む。そして、この戻り光はファイバのコアを逆行してビームスプリッタ立方体64（これはダイクロイックミラー型でもよい）に入射し、レーザー光は取り除くがストークスシフト蛍光は通すフィルタ71を通過し、レンズ72によってカメラヘッド74内の感光フィルム73上に集束される。

カメラヘッド74にはスキャナ75が取り付けられ、これはスキャナ67と大体同じで、信号発生器68から接続76、77を介して走査移動信号を受ける。スキャナ75は、フィルム73に集束される戻り光を、標本内のスポットと同期して走査させ、走査移動はファイバ束の各端部の2組のファイバコアに対して同一の向きにされる。

図2に示された顕微鏡は、複数の光ファイバを使用することによって、より安価な非干渉性光源の採用を可能にする点を除いて、光学的にも機械的にも図1に示されたものと非常に類似している。標本タイプの特定のセットに対して焦点面の最適な分離を達成するために、コア面積とクラディング面積のベストの比率を得るよう、ファイバのクラディングサイズを選定することが望ましい。

図3は、通常の内視鏡で使用されるような公知の干渉性ファイバ束を採用した顕微鏡システムを示す。従って、ファイバは、図2の実施例で使用された束のファイバより、クラディング面積がずっと小さい。これにより、非レーザー光源が使用でき、通常の内視鏡が共焦点顕微鏡に変換できる。共焦点焦点面の分離を可能にする、中間焦点面に設けられた薄い不透明膜の1つ以上の

ピンホールまたはスリットの移動によって走査が行われる。

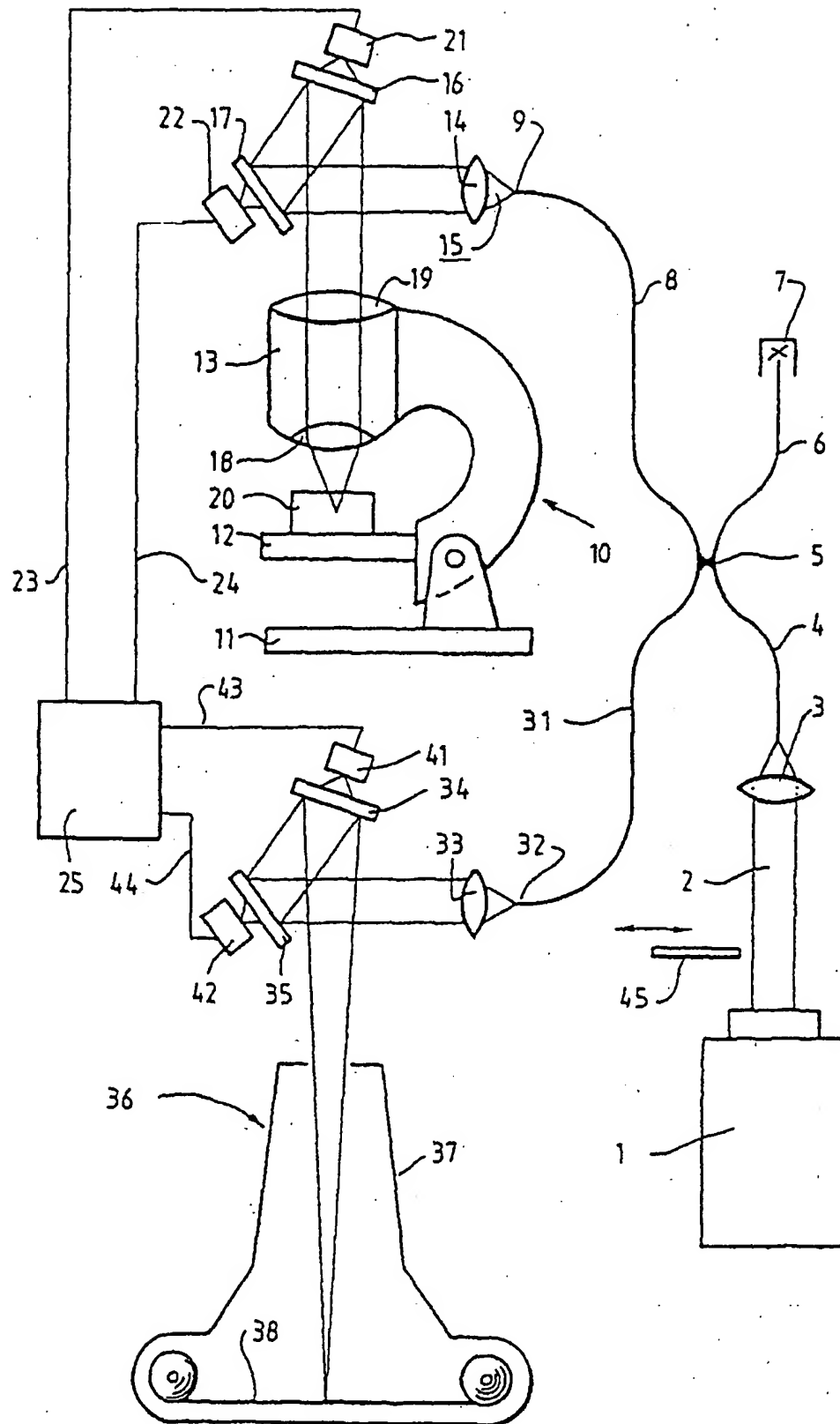
図3に示された顕微鏡システムは光源81を備え、これは短いアーク水銀ランプでよい、光源81からの光はレンズ82とフィルタ83を通り、フィルタは、ダイクロイックミラー85を備えたビームスプリッタ84へ所期のスペクトル線を分離する。光源81からの光は、ミラー85によって、アパーチャ手段87を持った光スクリーン86へ向けて屈折される。アパーチャ手段は1個以上のスリットか10 個以上の個々のピンホールの形でよい。アパーチャ手段87を通過する光は、別のレンズ88によって、従来の内視鏡に使用されるものと同じ種類でよい干渉性ファイバ撮像束91の端部89へ集束される。レンズ88は、スクリーン86のスリットまたはピンホール87の像を、ファイバ束91の端部89へ投影し、この光は束の他端92へ伝搬され、そこから出ると、顕微鏡レンズ93、94、95によって、顕微鏡ステージ97に載置された標本96上またはその内部の1つ以上のラインまたはスポットに再集束される。対物レンズ95の焦点面からの蛍光または反射光は、レンズ95、94および93を通過して戻り、照明光が出てきたのと同じファイバに再入射する。焦点はずれ部分からの光は、実質的に束内の他のファイバ通ってファイバ束に戻る。

ファイバ束91の端部89から出ると、戻り光は光スクリーン86が位置する中間焦点面90で再集束される。共焦点状の戻り光はアパーチャ手段87を逆方向に通過するが、標本の焦点ずれ部分から戻る光はスクリーン86が遮断する。アパーチャ手段87を通った戻り光はビームスプリッタ84を通過し、レンズ98によって、カメラヘッド101内に保持されたフィルム99上に集束される。

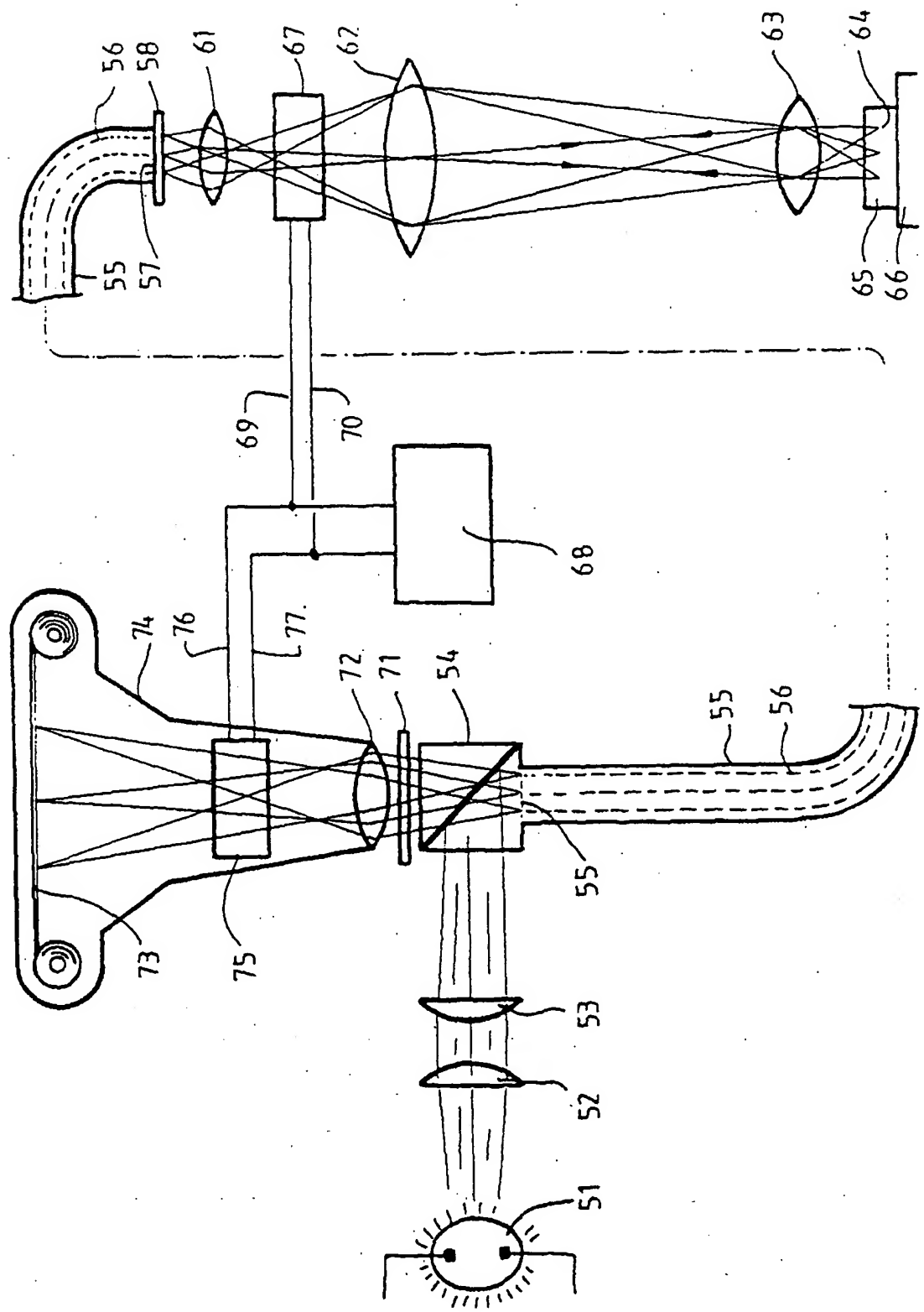
図3に示された実施例では、標本とカメラ内のフィルムの両者に対する走査は、矢印102で示すような光スクリーン86の走査動によって行われる。つまり、スクリーン86は照明および戻り光路を横切る方向に往復する。中間焦点面90にアパーチャ手段87を支持するスクリーン86の走査運動は、標本の焦点面全体の可視化を可能にする。蛍光を結像する場合は、光路にロングパス光学フィルタ103を介在させることができる。

図4は、図3に示されたものと本質的に同じ顕微鏡システムを示し、同じ部材には同じ参照番号が付されている。この場合、顕微鏡は、図3に示された顕微鏡の多レンズ撮像システムの代わりに、単一の対物レンズ111が取り付けられた内視鏡ヘッド110が、光ファイバ束91の外方端に取り付けられるという改変がなされている。これはヘッドと内視鏡の作用を小型化を可能にする。それ以外では、顕微鏡は図3に示されたものと同様に作用する。

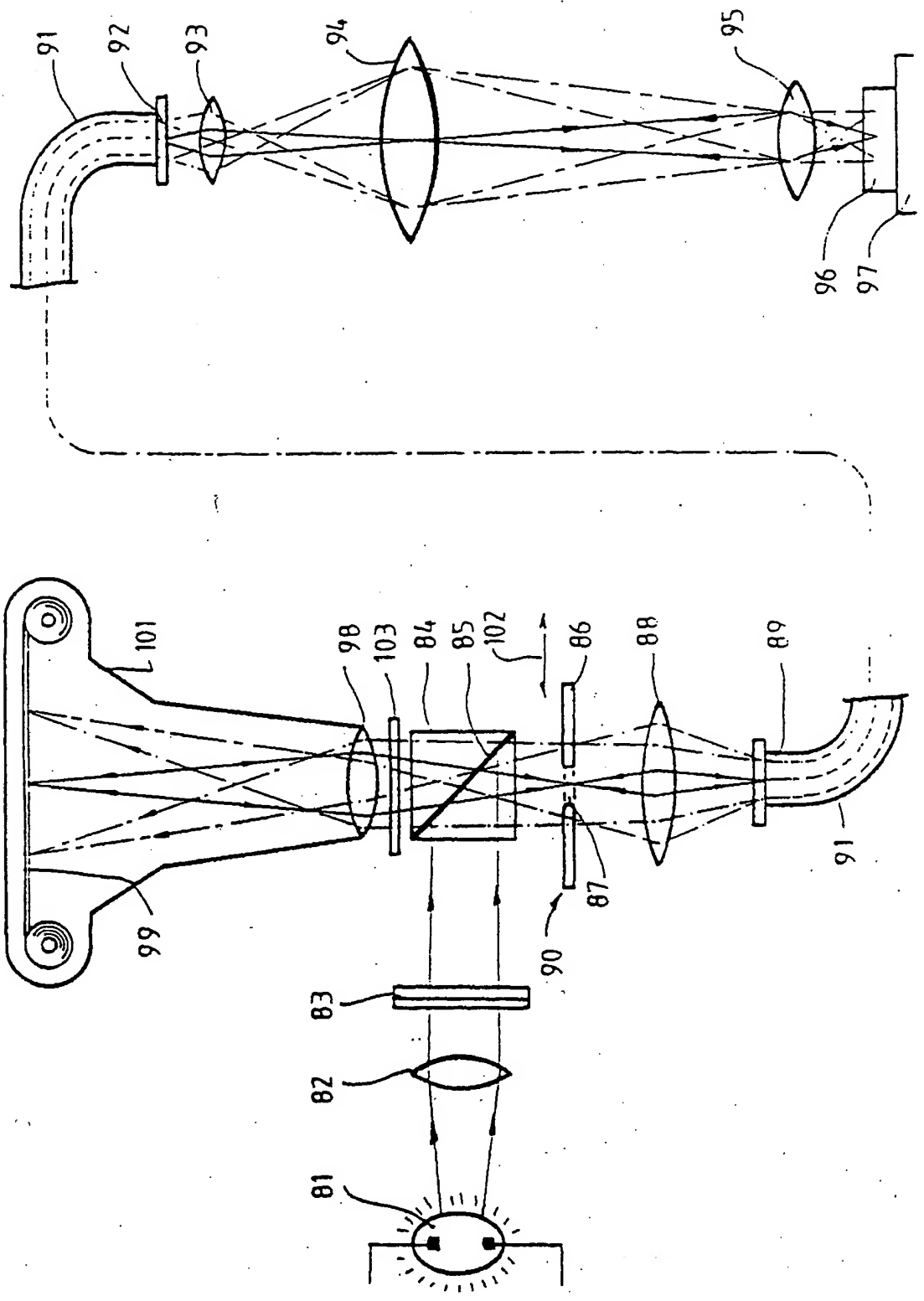
【第1図】



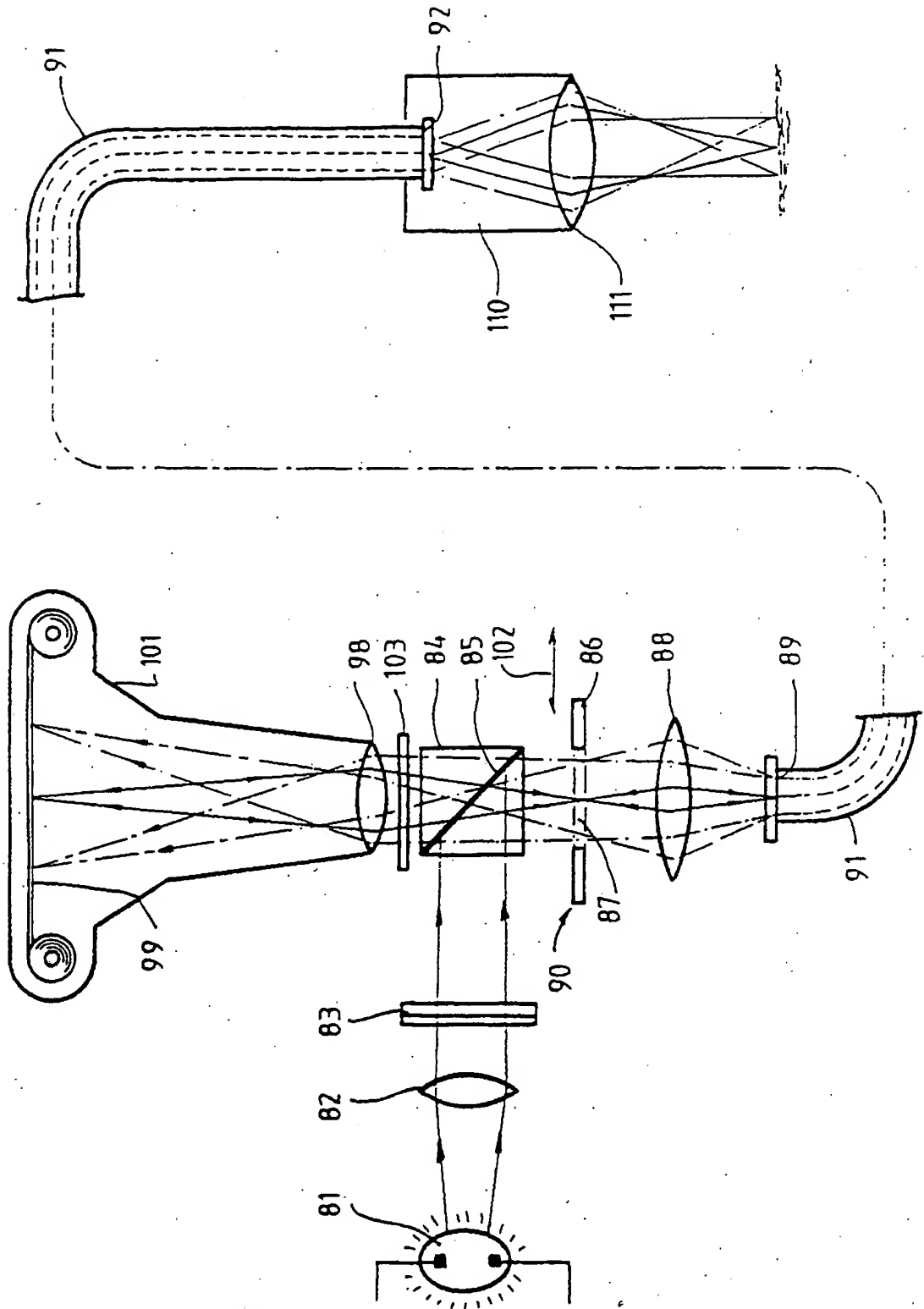
【第 2 図】



【第3図】



【第4図】



フロントページの続き

- (31) 優先権主張番号 PK 3 2 3 3
(32) 優先日 平成 2 年 11 月 8 日 (1990. 11. 8)
(33) 優先権主張国 オーストラリア (AU)
(56) 参考文献 特開 昭 62-211503 (JP, A)
特開 昭 62-218916 (JP, A)
特開 昭 61-219919 (JP, A)
(58) 調査した分野 (Int. Cl. ⁷, DB 名)
G02B 21/00
G02B 21/06 - 21/36